

Российская академия наук
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
Общество физиологов растений России
Научный совет по физиологии растений и фотосинтезу
РАН

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
СОВРЕМЕННОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Всероссийская научная конференция с
международным участием и школа для молодых
ученых,
посвященная 125-летию Института физиологии
растений им. К.А. Тимирязева РАН

Москва, 23-27 ноября 2015 г.

Сборник материалов

**Москва
2015**

Перевод микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* в состояние ангидробиоза, хранение и реактивация

Харчук И.А.

ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского
РАН, Севастополь, Россия

Водоросли (наряду с бактериями) - одни из древнейших организмов, населяющих планету. В общем круговороте веществ в природе они являются существенным звеном трофических цепей, поставляя значительную часть органического вещества и кислорода. Микроводоросли обладают мощным биосинтетическим потенциалом, как продуценты широкого спектра разнообразных полезных соединений, поэтому сохранение их биоразнообразия является актуальной задачей. Коллекции микроводорослей являются источником первичного исследовательского материала как для гидробиологии и альгологии, так разных областей биологии в целом, депозитарием признанных перспективных и вероятно перспективных в технологическом отношении объектов, учебным материалом при подготовке специалистов-биологов, а также одним из средств сохранения видового и генетического биоразнообразия водорослевого мира, в частности, путем биоконсервации. Поддержание микроводорослей в коллекциях в жизнеспособном состоянии нуждается в значительных материальных затратах и времени, и требует высокой квалификации персонала. Кроме того, любая мировая альгологическая коллекция, включая таких исполинов коллекционного дела как SAG, UTEX, CCAP, сталкивается с явлениями непрогнозируемой гибели культур, с контаминацией штаммов грибами, бактериями, простейшими, другими водорослями. Поэтому современные исследования в области разработки и оптимизации способов поддержания культур микроводорослей в жизнеспособном состоянии сконцентрированы на методах, которые основываются на сохранении культур микроводорослей в состоянии анабиоза (криптобиоза). Большинство альгологических исследований в этой области направлены на изучение разных аспектов сохранения микроводорослей путем криоконсервации. При этом альтернативным методом, к которым принадлежит и сохранение водорослей в состоянии ангидробиоза, надлежащего внимания сейчас не отводится. Оптимальные способы перевода микроводорослей в состояние ангидробиоза и реактивации дегидратированных культур остаются не определенными, сроки сохраняемости - противоречивыми, степень повреждения генетического аппарата при разных условиях и в зависимости от сроков хранения - почти не исследованными. Для многих видов морских микроводорослей включая диатомовые водоросли разработаны способы криоконсервации [1, 2, 3, 4]. Работ по переводу диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* в состояние ангидробиоза нет, поэтому целью работы было исследовать возможность перевода диатомовой микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* в состояние ангидробиоза, её хранение в обезвоженном состоянии и реактивацию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была культура *Phaeodactylum tricornutum* (штамм IBBS – 36) из коллекции отдела биотехнологии и фиторесурсов ИМБИ РАН. Микроводоросли культивировали в накопительном режиме, при постоянном круглосуточном освещении и автоматическом перемешивании с использованием насоса для удаления избытка кислорода из среды и равномерного прогрева всего слоя питательного раствора культуры. Интенсивность света на поверхности раствора составляла 8 кЛк. Температура среды колебалась в диапазоне 25-29°C. В качестве питательной среды использовали среду Тренкеншу [5]. Объём среды в культиваторах составлял 1 л, при высоте слоя раствора 45 см. На стационарной фазе роста культуру микроводорослей концентрировали центрифугированием на лабораторной центрифуге ОПН-3-УХЛ 42 при 3000 об./мин.. Затем полученную пасту водорослей высушивали до воздушно-сухого состояния в термостате при температуре 30-55°C. Обезвоженные клетки хранили в герметично закрытых полиэтиленовых упаковках, в темноте при температуре 15-20°C. Реактивацию микроводорослей проводили в чашках Петри. Исходя из полученных ранее результатов [6, 7], в качестве растворов для реактивации использовали среды для культивирования, разбавленные в соотношении 1:1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные морфометрические измерения клеток водоросли *Ph. tricornutum* позволили установить изменения их размеров при обезвоживании (табл. 1), так диапазон колебаний морфометрических характеристик *Ph. tricornutum* (ширина и длина) во время обезвоживания не превышал одного микрона, но эти изменения были статистически значимыми. Ширина клеток сокращалась на 5 % ($t = 2,12 > t_{05} = 2,00$), длина – на 11 % ($t = 5,54 > t_{05} = 2,00$), объём клеток – на 18 % ($t = 2,74 > t_{05} = 2,00$), при этом площадь поверхности сокращалась на 13 % ($t = 3,31 > t_{05} = 2,00$). Во время реактивации в течение 24 часов морфометрические характеристики (ширина, длина, объём и площадь поверхности клеток) *Ph. tricornutum* не изменялись. Через 24 ч после обводнения отчётливо был виден хроматофор, размеры клеток и их численность практически не изменялись. Восстановление первоначальных размеров клеток было отмечено на 20–30 день. Через 1 мес. в реактивированной культуре зарегистрированы делящиеся клетки и появление двурогой формы.

Таблица 1

Изменение размеров клеток *Phaeodactylum tricornutum* (трехлучевая форма) при обезвоживании и последующей реактивации

Образец	Размерные характеристики (средние для 50 промеров)*				
	Ширина клеток, мк	Длина клеток, мк	Объём клеток, мк ³	Площадь поверхности клеток, мк ²	Индекс сферичности клеток, мк
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (трехлучевая форма)					
Контроль	11,37 ± 0,37	8,87 ± 0,28	235,19 ± 28,12	266,83 ± 16,13	0,683 ± 0,02
Сухие	10,83 ± 0,33	7,92 ± 0,18	191,70 ± 14,75	232,53 ± 12,63	0,692 ± 0,01
24 часа	10,72 ± 0,43	7,65 ± 0,27	186,99 ± 19,13	225,94 ± 16,49	0,700 ± 0,02

При электронно-микроскопических исследованиях обезвоженных клеток *Ph. tricornutum* была обнаружена складчатость поверхности и её неоднородность. На поверхности клеток образуются небольшие углубления или выпячивания в виде пузырьков, капель, частиц различных форм и размеров (рис. 1). Как известно, диатомовые водоросли имеют прозрачный панцирь, состоящий из аморфного кремнезема, напоминающего по составу опал, куда входят некоторые металлы и органические компоненты, возможно, белок [8]. Толщина стенок панциря зависит от содержания кремния в среде. Панцирь образован различными структурными элементами, из которых наиболее важными является перфоративная система отверстий различного строения, расположенная на створках, через которую происходит обмен протопласта с внешней средой. Через эти отверстия диатомовые водоросли выделяют слизь, которая способствует образованию колоний. Слизь диатомей имеет различную консистенцию – от плотной, хрящевой, до жидкой [8].

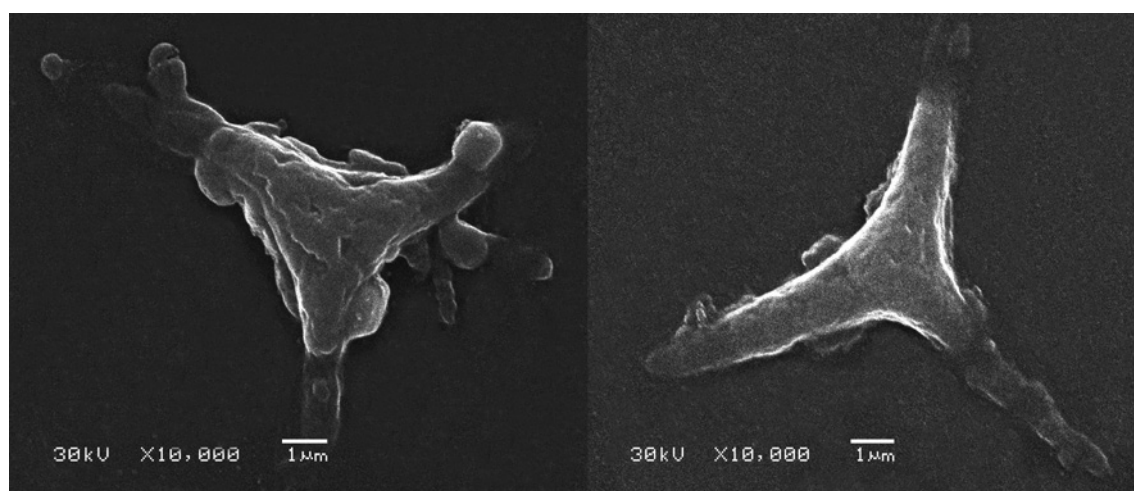


Рис. 1. Обезвоженные клетки *Phaeodactylum tricornutum*. Препараты приготовлены без применения химической фиксации ($\times 10,000$)

Складчатость поверхности, которая хорошо видна на фотографии, может быть обусловлена реакцией слизистой обертки на обезвоживание. Обнаруженные на поверхности организмов образования в форме пузырьков, капель и их скоплений различной формы, по всей вероятности, связаны с выделением из обезвоженных клеток при их дегидратации различных веществ. Среди них могут быть неорганические соединения, аминокислоты, нуклеотиды, углеводы, липиды, отдельные белки и т. д. Возможно, что в описанных выше экспериментах мы также имели дело с выделением из клеток продуктов, близких по составу к материалу клеточного содержимого и плазмалеммы. Однако для подтверждения этих предположений требуются дополнительные исследования. Как известно, обезвоживание сопровождается удалением воды из клеток. Следствием потери воды является сокращение их объёма, что влечет за собой изменение морфометрических характеристик клеток. Сопоставление полученных нами данных с результатами других исследователей [9] указывает на одинаковую реакцию клеток на обезвоживание, независимо от их систематической принадлежности, что имеет большое значение для изучения механизмов реакций различных клеток на разнообразные внешние воздействия. В зависимости от того, насколько серьёзные

изменения произошли во время обезвоживания, процесс реактивации будет удлиняться или сокращаться.

Исследовано влияние длительности хранения на жизнеспособность культур в состоянии ангидробиоза. Определение жизнеспособности *Ph. tricornutum* вызывало определённые затруднения при дифференциации реактивируемых клеток из-за наличия кремневого панциря, поэтому критерием жизнеспособности был рост на жидких питательных средах. Реактивации подлежали культуры на разных сроках хранения (табл. 2). После обводнения клеток во время фазово-контрастного и люминесцентного микроскопирования все клетки ярко светились. Через месяц от начала реактивации отмечали деление клеток.

Таблица 2

Зависимость жизнеспособности клеток *Phaeodactylum tricornutum*
от сроков хранения

Срок хранения, мес.	Температура дегидратации, °C	Время дегидратации, ч	Остаточная влажность, %
36	50	48	14,0
36	55	72	12,1
24	50	48	13,8
24	55	72	11,6
2	30	46	7,7

Наибольшее количество молодых клеток обнаружено в культурах с остаточной влажностью 14 %, сохраняемых в течение 24 и 36 мес, меньше – в культурах, обезвоженных до остаточной влажности 11,6 и 12,1 %, также пребывающих в состоянии ангидробиоза 24 и 36 мес, соответственно. У *Ph. tricornutum* с остаточной влажностью 7,7 % после реактивации молодых клеток не выявлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у диатомовой микроводоросли *Ph. tricornutum*, в процессе обезвоживания происходят стойкие морфометрические изменения клеток, для восстановления которых требуется более продолжительный период времени. Очевидно, физиологической реакцией на обезвоживание является образование «складчатости» цитоплазматической мембраны, возникающей из-за значительного уменьшения размеров клетки при дегидратации. Установлено что, для сохранения *Ph. tricornutum* в жизнеспособном состоянии необходимо, чтобы остаточная влажность обезвоженных культур находилась в пределах 11,6–14 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meyer M. A. Criopreservation of a marine diatom // Sci. and Eng. Ser. B. 1986. V. 47, № 1. P. 125.
2. Redekar P.D., Wagh A.B. Cryopreservation studies on the marine diatom *Navicula subinflata* Grun. // Seaweed Res. Utiln.. 2000. V.22 (1.2). P. 183 – 187.
3. Day J.G., Benson E.E., Hardmg K., Knowles B.K., Idowu M., Brenner D., Santos L.,

- Santos F., Friedl F., Lorenz M., Elster J., Lukavskl J., Herdman M., Rippka R., Hau T. Cryopreservation and conservation of microalgae: the development of a pan-european scientific and biotechnological resource (the cobra project). // CryoLetters. 2005. V.26 (4). P. 231-238.
4. Boroda A. V., Aizdaicher N. A., Odintsova N. A. The influence of ultra-low temperatures on marine microalgal cells // Journal of Applied Phycology February. 2014. V 26, Issue 1. P. 387-397
 5. Тренкениш Р. П., Беянин В. Н., Сидько Ф. Я. Модель светозависимого роста морских микроводорослей (с учетом фотоингибирования). Красноярск: ИФСО. 1981. 63 с. – (Препринт / Ин-т физики, сиб. отд-ие; 18Б).
 6. Харчук И. А. Способ реактивации цианобактерий *Spirulina platensis* (Nordst) из ангидробиоза // Экология моря. 2003. Вып. 64. С. 86–89.
 7. Харчук И.А. Вплив деяких факторів на реактивацію *Spirulina platensis* Nordst (Arthrospira) // Наукові основи збереження біотичної різноманітності (тематичний збірник). Львів: Ліга-Прес, 2006. Вып. 6. С. 296 - 300.
 8. Вассер С. П., Кондратьева Н. В., Масюк Н. П. и др Водоросли. Справочник / под ред. С. П. Вассер. Киев: Наук. думка, 1989. 608 с.
 9. Бекер М. Е., Дамберг, А. И. Рапопорт. Анабиоз микроорганизмов. Рига: Зинатне, 1981. 252 с.